

**Analyses génétiques sur des échantillons de Loutre (*Lutra lutra*)
de Poitou-Charente, Nouvelle Aquitaine.**

Lise-Marie Pigneur & Johan Michaux
Laboratoire de génétique de la Conservation – GeCoLAB
Université de Liège

Contexte de l'étude

L'objectif de ce projet a été d'effectuer une étude génétique des populations de loutres de la Nouvelle Aquitaine à partir d'approches non invasives et la collecte d'épreintes. Les principales questions posées sont une meilleure compréhension de l'origine des loutres vivant dans cette région, de leur diversité génétique et risques de consanguinité, de leur sexe ratio ou encore des liens existant entre ces populations et celles des régions environnantes (région pyrénéenne, façade Atlantique, Bretagne, Limousin...). Les échantillons collectés par Cistude Nature ont ainsi été analysés génétiquement et comparés avec une banque de données reprenant les principales lignées génétiques de loutres précédemment mises en évidence sur le territoire français (Pigneur *et al.* 2019).

Echantillons

Un lot de 39 échantillons d'épreintes de loutres nous a été fourni par Jean-Baptiste Pons de Cistude Nature (Tableau 1, figure 1). Ces échantillons ont été comparés à plus de 150 échantillons provenant d'autres régions françaises.

N-tube	Date	Association	Observateurs	Departement	Commune	Lieu-dit	Latitude_Lambert_93	Longitude_Lambert_93	Cours_d'eau
86-Clain-1	6/07/19	VN	Galledrat_Miguel	86	Payroux	Le_Clain - Gue de la Chanfaronnerie	6571661,005	507093,4631	Clain
86-Vonne-1	25/08/19	VN	Galledrat_Miguel	86	Marigny-Chemereau	La_Vonne-Cirque_de_Giez	6595643,982	488111,385	Vonne
86-Dive-1	10/09/19	VN	Begoin_Sarah	86	Couhe	Valence	6582993,35	483244,84	Dive_de_Couhe
86-Clain-2	26/10/19	VN	Galledrat_Miguel	86	Vivonne	Le_Clain-Pont_piscine	6594895,45	489387,96	Clain
86-Clain-3	26/10/19	VN	Galledrat_Miguel	86	Vivonne	Le_Clain-Pre_Cholet	659217,37	488690,02	Clain
86-Palais-1	13/11/19	VN	Begoin_Sarah	86	Marçay	Le_Palais (pont) - la Chaume	6598195,66	487049,43	Le_Palais
86-Benete-1	12/11/19	VN	Begoin_Sarah	86	Saint-Gervais-les-Trois-Clochers	Ruisseau du Font_Benete (pont) - la cò	6646803,89	503413,71	Le_Font_Benete
86-Goberte-1	28/02/20	VN	Galledrat_Miguel	86	Mazerolles	Ruisseau_de_Goberte - La_Chaufferie	6592113,32	522000,45	Le_Goberte
79-LaBeronne-1	20/07/19	DSNE	Prioul_Yoann	79	Melle	Loubeau	6572609,83	457193,55	La_Beronne
79-LaCourance-2	27/08/19	DSNE	Prioul_Yoann	79	Epannes	Les_Renfermis	6576654,9	423154,26	La_Courance
79-LeThouet-3	6/10/19	DSNE	Tudoux_Joël	49	Vaudelnay	Bourneuf	6674697,39	459922,43	Le_Thouet
79-LeThouaret-4	13/09/19	DSNE	Sechet_Vanina	79	Boismé	Le_Muscadet	6635761,42	438087,17	Le_Thouaret
79-L_Autize-5	13/09/19	DSNE	Sabourin_Alain	79	Saint-Pompain	Le_Moulin_Maret	6600180,73	423621,8	L_Autize
79-L_Argenton-6	18/09/19	DSNE	Koch_Guillaume	79	Argentonnay	Pont_Cadore	6659584,14	438644,43	L_Argenton
79-RuisseauClesse-7	13/10/19	DSNE	Rolland_Ludovic	79	Clesse	Saint-Benoît	6632187,44	439856,76	Ruisseau_de_Clesse
LPO_01	30/10/19	LPO	Rigou_Pierre	17	St-Bonnet-sur-Gironde	Pont_de_Petit_Bois	6479272	416466	Ferat
LPO_02	30/10/19	LPO	Rigou_Pierre	17	St-Bonnet-sur-Gironde	le Perat	6479500	413849	Ferat
LPO_03	30/10/19	LPO	Rigou_Pierre	17	St-Georges-des-Agouts	Chez_Gatineau	6481505	414924	Molle
LPO_04	30/10/19	LPO	Rigou_Pierre	17	St-Thomas-de-Conac	les Joncs	6484916	412914	Ruisseau_des_Joncs
LPO_05	30/10/19	LPO	Rigou_Pierre	17	St-Dizant-du-Gua	Morisset	6487777	411967	Tailion
LPO_06	30/10/19	LPO	Rigou_Pierre	17	Meursac	les Epeaux	6512105	404867	Ombrail
LPO_07	28/08/19	LPO	Rigou_Pierre	17	Allas-Champagne	Bonnenfant	6490310	438661	Trefle
LPO_08	28/08/19	LPO	Rigou_Pierre	17	Marignac	Chaudron	6497402	431825	Mortier
LPO_09	28/08/19	LPO	Rigou_Pierre	17	Celles	Marais_Tonnaud	6508461	436167	Ne
LPO_10	28/08/19	LPO	Rigou_Pierre	17	Fleac-sur-Seugne	Font_Robin	6500147	425108	Medoc
17-La-Greve-Sur-Mignon-20	6/12/19	NE17	Robinet_Charly	17	Cresse	Cresse - centre-bourg	6540129	450379	Source_des_Lilas
NE17_Virson_2019	10/01/20	NE17	Robinet_Charly	17	Saint-Christophe	le Pere	6567579	398591	Le_Virson
2	20/11/19	Charente_Nature	Dorfiac_Mathieu	16	Saint-Germain-de-Confolens	Saint-Bernard	6552994	521221	
1	20/11/19	Charente_Nature	Dorfiac_Mathieu	16	Lessac	Vignes_Buroux	6553016	521246	
3	20/11/19	Charente_Nature	Dorfiac_Mathieu	16	Lessac	Vignes_Buroux	6553013	521249	
4	5/12/19	Charente_Nature	Dorfiac_Mathieu	16	Longre	Pres_Cholons	6547787	467523	
5	16/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Saint-Fort-sur-le-Ne	île de la Maille	6502647	442005	
6	16/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Saint-Fort-sur-le-Ne	île de la Maille	6502647	442005	
7	17/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Eymouthiers	Fontaine_Saint-Pierre	6507967	509570	
8	23/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Guizengeard	L_Avenant	6472253	455951	
9	23/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Guizengeard	Marais_de_l_Avenant	6472176	455988	
10	23/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Guizengeard	Marais_de_l_Avenant	6472176	455988	
11	23/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Guizengeard	L_Avenant	6472352	455995	
12	16/12/19	Charente_Nature	Gervot_Meryl	16	Mesnac	Moulin_de_Chazotte	6524348	438861	

Tableau 1. Origines et codes des échantillons fournis. Les échantillons en grisé correspondent à des échantillons dont l'ADN était fortement dégradé et dont l'analyse a donné un résultat non interprétable

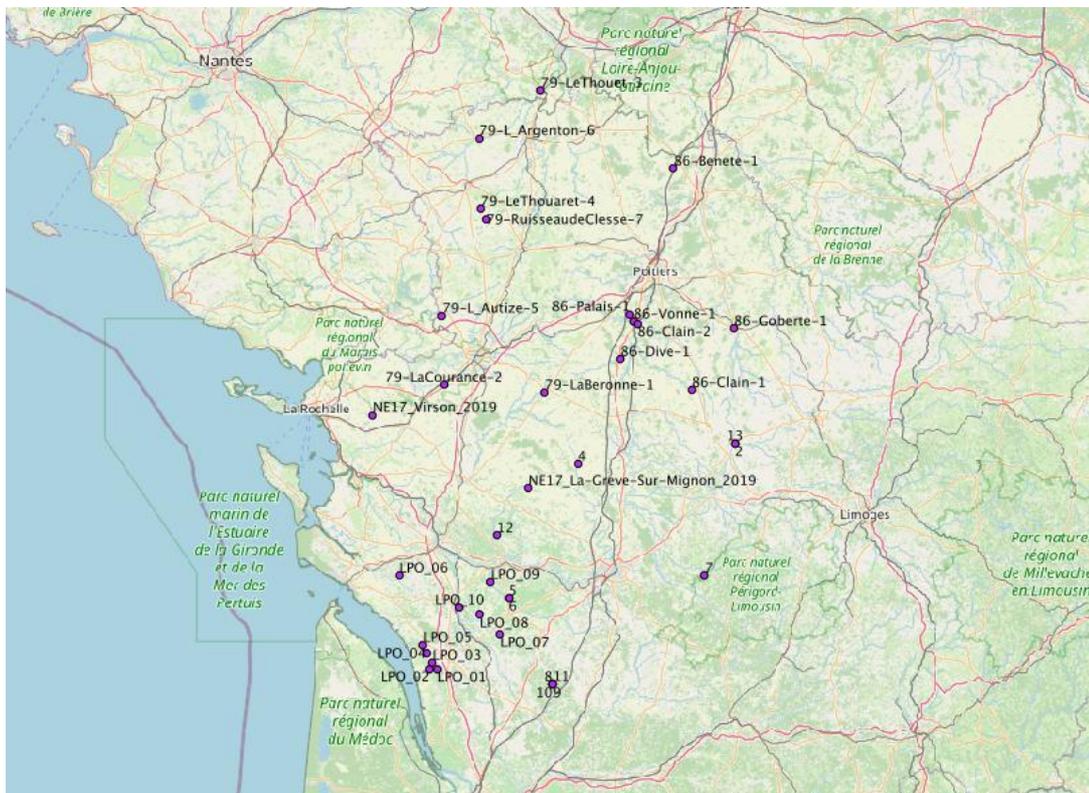


Figure 1 : Distribution géographique des échantillons analysés dans le cadre de la présente étude.

Extraction de l'ADN

L'ADN de chaque échantillon a été extrait via le kit DNA Stool extraction kit (Qiagen) pour les fèces.

Amplification des marqueurs étudiés

Suivant les travaux de Dallas et al. (2000 ; 2002), Dallas et Piertney (1998) et Janssens et al. (2008), nous avons développé nos analyses sur base de 15 marqueurs microsatellites récemment utilisés avec succès dans une série d'autres études sur des problématiques similaires. Un des 15 marqueurs (LutSRY) est spécifiquement utilisé pour déterminer le sexe. Les amorces (primers) permettant l'amplification de ces différents marqueurs sont présentées au tableau 2.

Les analyses ont été réalisées en utilisant trois mix multiplex, permettant d'analyser les échantillons de loutres selon les 15 microsatellites par trois passages en séquenceur automatique (au lieu de 15 si les marqueurs devaient être analysés individuellement). Ce type de stratégie permet de gagner un temps non négligeable en terme d'analyse sur séquenceur automatique. Pour cela, un des primers de chaque microsatellite a été marqué par un fluorochrome particulier. Dans le cas de notre étude, quatre types de fluorochromes ont été choisis (VIC, FAM, PET et NED) (Tableau 2). Le type de fluorochrome choisi pour chaque microsatellite a été basé sur la taille de fragments de chacun de ceux-ci. Vu la variabilité en taille des marqueurs utilisés, nous avons ainsi choisi de ne pas dépasser 5 microsatellites par run, ce qui permet de les analyser tous en trois passages seulement.

Tableau 2. Liste des marqueurs microsatellites utilisés dans le cadre de cette étude et choix des fluorochromes sélectionnés pour chacun de ces marqueurs.

Nom du marqueur	Fluorochrome sélectionné	Séquence
Lut435F	PET	TGAAGCCCAGCTTGGTACTTC
Lut435R		ACAGACAGTATCCAAGGGACCTG
Lut453F	PET	AGTGCTTTGTACTTGGTAATGG
Lut453R		AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC
Lut457F	VIC	CAGGTTTATGGCTTTATGGCTTTC
Lut457R		CAGGGTTTGATTTCTGGTGAGG
Lut604F	FAM	TATGATCCTGGTAGATTAAC TTTGTG
Lut604R		TTTCAACAATTCATGCTGGAAC
Lut701F	FAM	GGAAACTGTTAAAGGAGCTCACC
Lut701R		CAGTGTCATAAGGATGCTCCTAC
Lut715F	VIC	TTCACAATAGCCAAGATATGGAC
Lut715R		TGGCATAATATCCTTTCTCATGG
Lut717F	FAM	TGTTGCCTTCAGAGTCCTGTG
Lut717R		GTCAGGCATTGTAACATATTCTCAG
Lut733F	PET	GATCTCATTTTAAATGTTCTTACCAC
Lut733R		TGGTTCTCTTGCAGGATCTG
Lut782F	FAM	GAGATATCACTAAGCAATACACGATG
Lut782R		ACAAAGACTGAGCAAAAACAAGC
Lut818F	NED	AAGGATGTGAAACAGCATTG
Lut818R		CCATTTTATACACATAAATCGGAT
Lut832F	NED	TGATACTTTCTACCCAGGTGTC
Lut832R		TCCTTAGCATTATCTTATTTACCAC
Lut833F	VIC	CAAATATCCTTTGGACAGTCAG
Lut833R		GAAGTTATCTAATTTGGCAGTGG
Lut902F	NED	CAGGAGTGAATGTAAAGAGTTGG
Lut902R		CTTACACCATTTGCAGACC
Lut914F	VIC	GAAACTCTGAAGTCAAAGAACATG
Lut914R		AGGCTCTGTACTGAGTGTGGAG
LutSRY-F	FAM	GAATCCCCAAATGCAAACTC
LutSRY-R		GGCTTCTGTAAGCATT TTTCCAC

Génotypage et analyse des données

Les microsatellites amplifiés et marqués par fluorochromes ont été génotypés au moyen d'un séquenceur automatique multicapillaire *Applied Biosystems 3730xl Genetic Analyser*. Les résultats du génotypage sont informatisés sous forme d'électrophérogrammes qui permettent de mesurer la taille en paire de bases des différents allèles des microsatellites. La taille des allèles dépend du nombre de répétitions qu'ils contiennent. La taille de ces allèles pour chaque microsatellite et par individus a été identifiée à l'aide du programme GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystem).

Dans le cas du matériel collecté de manière non invasive (fèces) et présentant un ADN de mauvaise qualité, nous avons systématiquement répété les génotypages de 3 à 5 fois pour chaque épreinte. Cette approche, appelée "méthode multitubes" permet en effet d'éviter au maximum le risque de fausse estimation d'excès d'homozygotes (et par là d'un faux signal de dépression de consanguinité), par présence d'allèles nuls.

Analyses statistiques

Une fois les typages microsatellites effectués, la matrice de données a été analysée selon les dernières approches statistiques développées dans le domaine de la génétique des populations.

Premièrement, l'identification individuelle des échantillons d'épreintes a été effectuée grâce au logiciel GIMLET (Valière, 2002). Cette méthode permet de détecter si plusieurs épreintes proviennent en fait d'un même individu.

Les données ont ensuite été corrigées puis analysées. Pour identifier la structure populationnelle, nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Ce logiciel permet de déterminer s'il existe une structure populationnelle quelconque et d'identifier le nombre de populations (K) en assignant chaque individu à un des clusters sur base de son génotype (méthode du *clustering* bayésien). Pour STRUCTURE, aucune affiliation géographique *a priori* n'est fournie au logiciel. Il est également supposé que les fréquences alléliques sont corrélées entre les populations sur base du modèle d'admixture. Une série de « runs » indépendants a permis de tester des nombres de clusters K allant de 1 à 10 populations et en utilisant un « burn-in » de 100.000 itérations suivi d'une seconde analyse de 1 000.000 itérations (MCMC). L'analyse pour chaque K a été répétée 10 fois afin de vérifier la robustesse du résultat. Après correction selon Evanno, les probabilités d'assignation des individus au nombre de clusters choisi ont été synthétisées et représentées graphiquement via la plateforme CLUMPAK (Kopelman et al. 2015).

Pour évaluer la diversité et la différenciation génétique du bassin versant de l'Hérault, le coefficient de consanguinité (F_{is}), la richesse allélique (A_r), l'hétérozygotie observée (H_o), l'hétérozygotie attendue (H_e), l'indice de fixation (F_{st}) et l'indice de différenciation D (D_{Jost}) ont été calculés grâce au package *diveRsity* (Keenan et al., 2013) dans R v3.6.3 (R Development Core Team 2008)

Résultats et discussion

Sur les 39 échantillons provenant de Poitou-Charente analysés dans la présente étude, 10 d'entre eux n'ont donné pratiquement aucune amplification. Les échantillons restants ont donné de très bonnes amplifications des différents loci microsatellites. Ce ratio d'échantillons ayant donné de bons résultats par rapport à ceux n'ayant pas donné de résultats satisfaisant correspond à ce qui est généralement observé lors d'études basées sur matériel non invasif comme les fèces.

L'analyse d'individualisation a montré que ces 29 échantillons semblent provenir de 28 individus distincts : les échantillons LPO01 et LPO03 proviennent d'un même individu.

Ces génotypes ont été comparés à plus de 150 génotypes présents dans notre banque de données et correspondant aux principales lignées génétiques observées sur le territoire français lors de nos précédentes études (Pigneur *et al.*, 2019). L'analyse de clustering STRUCTURE a permis de mettre en évidence 5 clusters génétiques au sein des populations de l'Ouest de la France conformément à nos précédentes études (voir Pigneur *et al.*, 2019).

L'assignation des échantillons de Poitou-Charente et Nouvelle Aquitaine s'est majoritairement reliée au cluster de la façade atlantique. Cependant, plusieurs échantillons apparaissent étroitement liés au cluster correspondant aux populations de loutre du Limousin. Les animaux appartenant à la lignée « façade Atlantique » semble se concentrer particulièrement au sud-ouest de la zone échantillonnée ainsi qu'aux alentours de Poitiers. Les animaux appartenant à la lignée « Limousin » apparaissent concentrés plutôt au Nord et à l'Est de la zone d'étude. Enfin, un individu présente un génotype correspondant à un mix de trois lignées génétiques différentes (façade Atlantique, Limousin et Massif Central), suggérant qu'il provient d'une reproduction entre parents appartenant à des lignées génétiques différentes.

La distribution géographique de ces différentes lignées génétiques dans la région étudiée est représentée à la figure 2.

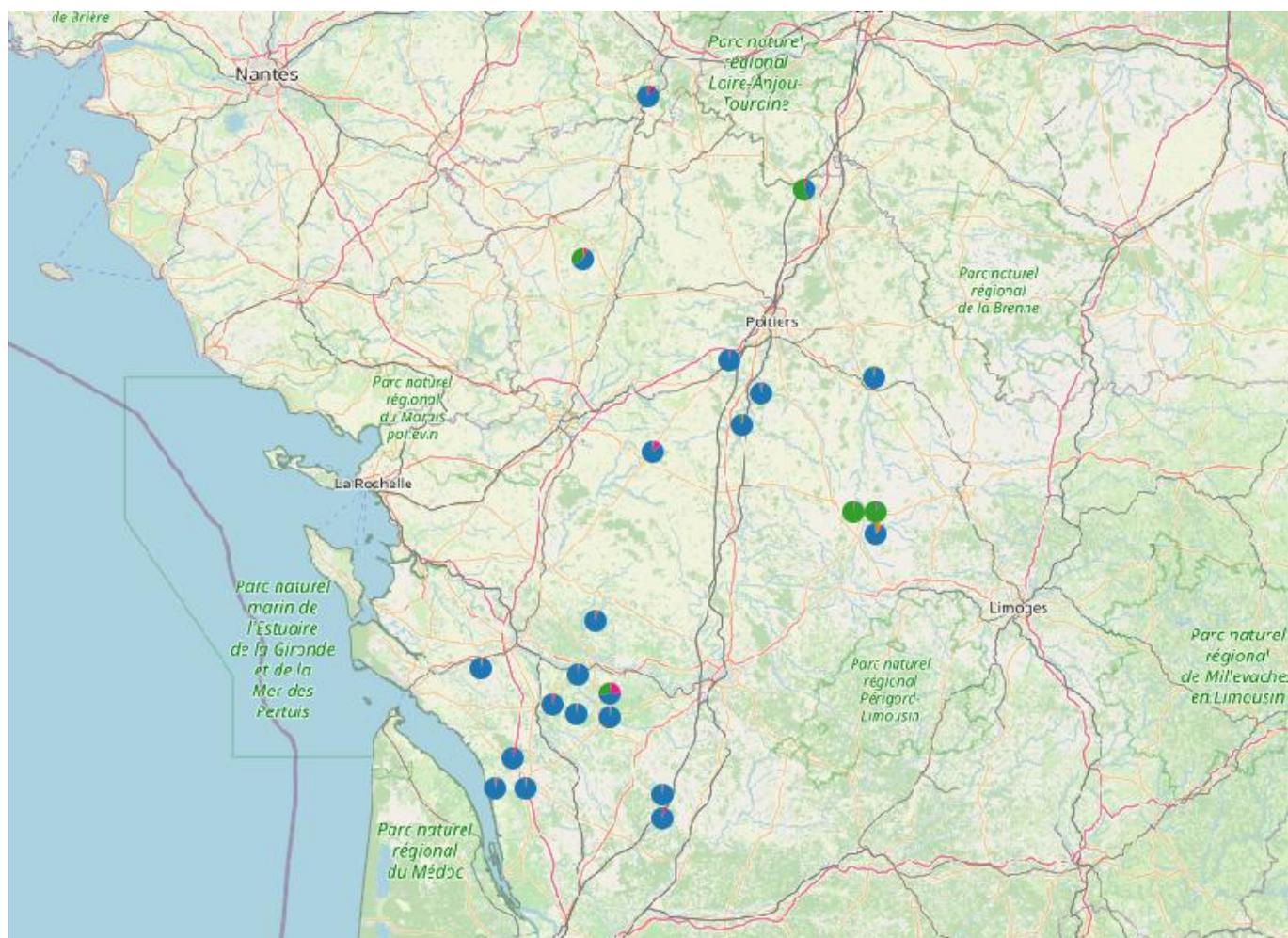


Figure 2 : Diagrammes représentent la probabilité d'appartenance des échantillons à chacun des 5 clusters définis par le programme STRUCTURE. Certains échantillons ne sont pas visibles pour cause de recouvrement. La couleur bleue correspond à la lignée génétique typique des populations de la façade Atlantique ; la couleur verte correspond à la lignée génétique observée dans la région du Limousin. L'échantillon coloré en trois couleurs différentes (vert, bleu et rouge) correspond à l'individu probablement mixé entre les lignées génétiques de la façade Atlantique, du Limousin et du Massif Central).

La diversité génétique des populations étudiées apparaît relativement similaire à ce que nous observons dans les autres régions de France, avec une richesse allélique moyenne de 2,31 pour le lot étudié ici. Les hétérozygoties observée et attendue sont respectivement de 0,4 et 0,57. Enfin, l'indice Fis permettant d'estimer les risques de consanguinité pour ces populations apparaît très important (0,29). Ce résultat semble étonnant puisque cette région constitue un point de rencontre entre plusieurs lignées génétiques, ce qui devrait limiter fortement les risques de consanguinité. Ce résultat apparaît très différent de ce qui est observé dans les autres régions de France étudiées. Il pourrait être biaisé du fait qu'une partie des échantillons collectés appartienne à des individus fortement apparentés, mais également par la présence de quelques données manquantes dans certains génotypes. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons dans la zone étudiée permettra très probablement d'infirmer ou confirmer ce résultat.

L'analyse du sexe ratio a pu être effectuée sur 33 échantillons. Elle montre un biais en faveur des mâles (n= 22, 66,6%) par rapport aux femelles (n= 11, 33%). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que plusieurs des zones étudiées soient encore en phase de recolonisation, favorisant ainsi les jeunes mâles erratiques au détriment des femelles plus philopatrices.

Tableau 2 : Identification du sexe au niveau des échantillons étudiés.

ID	Sexe
11	F
12	M
1	M
2	F
3	M
4	M
7	M
5	M
9	F
8	F
6	M
79-LaBeronne-1	F
79-LaCourance-2	F
79-LeThouet-3	M
79-LeThouet-4	F
79-L'Argenton-6	F
79-Ruisseau de Clessé-7	M
79-L'Autize-5	M
86-Benête-1	M
86-Clain-1	M
86-Clain-2	M
86-Clain-3	M
86-Dive-1	M
86-Goberté-1	M
86-Palais-1	M
LPO02	F
LPO03	M
LPO01	M
LPO04	F
LPO06	F

LPO08	M
LPO09	M
LPO10	M

Conclusions

Cette étude a permis d'obtenir des informations inédites concernant la zone étudiée : la région de Poitou-Charente en Nouvelle Aquitaine. Les résultats obtenus démontrent que les animaux analysés appartiennent principalement à deux lignées génétiques caractéristiques de la façade Atlantique et du Limousin. Le sexe ratio apparait favoriser les mâles, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que cette région est toujours en phase de recolonisation et ce type de zone est souvent caractérisée par la présence de jeune mâles erratiques en phase de colonisation au détriment des femelles plus philopatrices. Enfin, la diversité génétique des populations étudiées apparait importante et cohérente avec ce qui est observé dans les autres régions de France. Cependant, un signal de risque de consanguinité est observé. Celui-ci devra cependant être confirmé par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons provenant d'autres zones non encore prospectées.

Références bibliographiques

- Dallas J.F . Piertney S.B. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Molecular Ecology*, 9, 1248-1251.
- Dallas, J. F. *et al.* 1999. Genetic diversity in the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biol. J. Linn. Soc.* **68**, 73-86.
- Dallas, J. F. *et al.* 2000. Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. *Conservation Genetics*, **1**, 181-183.
- Janssens X., Michaux J.R., Fontaine M.C., Libois R., de Kermabon J., Defourny P. and Baret P.V. 2008. Non-invasive genetics at basin scale reveals barriers to the present otter recovery in Southern France. *Ecography*, **31**, 176-186.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T. F., Crozier, W. W., Prodöhl, P. A., & O'Hara, R. B. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(8), 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
- Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A., Mayrose I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **15**(5): 1179-1191.
- Pigneur L-M. , Michaux J., Caublot G., Fournier-Chambrillon C., Fournier P. (2014a) Sur les traces de la Loutre dans le Limousin... In: *L'Echo du PNA Loutre : Bulletin de liaison du Plan National d'Actions en faveur de la Loutre d'Europe*. 7 , 5-7.
- Pigneur L.-M., Marc D., Fournier P., Fournier-Chambrillon C., Steinmetz J., Rieu L., Giralda-Carrera G., Urra F., Van Doninck K., Michaux J. (2014b) La Loutre en France et Navarre. *Actes du 36ème colloque francophone de mammalogie. Climat, paysages, perceptions. Les Mammifères sauvages face aux changements globaux: TAIS. Bulletin des Mammalogistes de Midi-Pyrénées*, **7**, 117-122.
- Pigneur L.-M., Caublot G., Fournier-Chambrillon C., Fournier P., Giralda-Carrera G., Grémillet X., Marc D., Simonnet F., Sourp E., Steinmetz J., Urra-Maya F., Michaux J. (2015) Génétique de la conservation de la Loutre d'Europe en France. Actes des 11e Rencontres Bourgogne-Nature. Les Mammifères sauvages - Recolonisation et réémergence. **21/22**, 384 p.

- Pigneur L.-M., Michaux J., Caublot G., Fournier P., Marc D., Simonnet F., Jacob G. (2018) Apport de la génétique pour l'étude de la dynamique des populations de Loutre d'Europe *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) en France. *Naturae*, **6**, 63-71.
- Pigneur L-M, Caublot G, Fournier-Chambrillon C, Fournier P, Giralda-Carrera G, Grémillet X, Le Roux B., Marc D, Simonnet F, Smitz N., Sourp E., Steinmetz J., Urra-Maya F. & Michaux JR. 2019. Current genetic admixture between relictual populations might enhance the recovery of an elusive carnivore, the European otter (*Lutra lutra*). *Conservation genetics*, <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01199-9>
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Valière N. 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, **10**, 1471-1478.